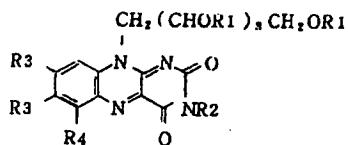


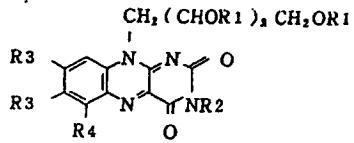
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素原子1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)

で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、チオシアノ酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して一般式

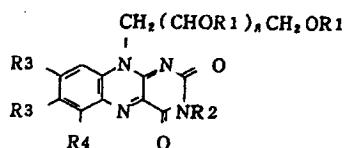


(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はテオシアナト基を表わす。)

で示される6テオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じてエステルを加水分解する一般式



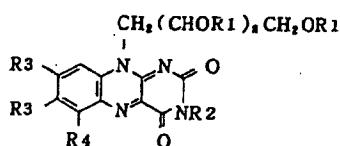
この発明のフラビン誘導体は、一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はテオシアナト基またはメルカブト基を表わす。)

で示されるものである。

この発明の別の発明のフラビン誘導体の製造方法は、一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)

で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化

(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はメルカブト基を表わす)

で示される6-メルカブトフラビン誘導体の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、新規なフラビン誘導体およびその製造方法に関するものである。

(従来の技術)

従来、フラビン誘導体としては、例えばリボフラビンやルミフラビンが市販されていた。

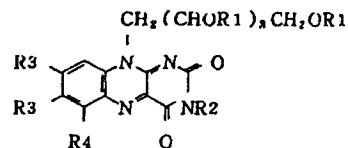
(発明が解決しようとする問題点)

上記リボフラビンやルミフラビンを、例えばチトクロームCやルブレドキシン等の電子伝達タンパク質を還元するための電極の修飾剤として用いることは困難であった。

この発明は、従来に代わる新規なフラビン誘導体およびその製造方法を得ることを目的とする。

(問題点を解決するための手段)

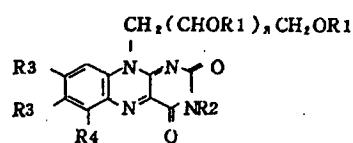
合物とした後、チオシアノ酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して、一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はテオシアナト基を表わす。)

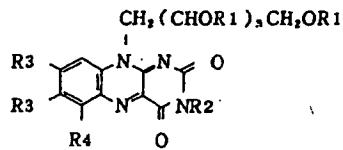
で示される6テオシアナトフラビン誘導体を得るものである。

この発明の別の発明のフラビン誘導体の製造方法は、一般式



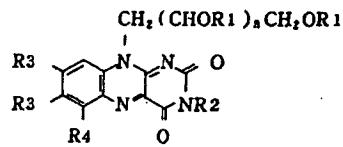
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)

で示される 6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、テオシアノ酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はテオシアナト基を表わす。)

で示される6-チオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はメルカブト基を表わす)

オシアナト基である6-チオシアナトフラビン誘導体は、文献上既知の6-アミノフラビン誘導体（バイオケミストリイ、19,2537(1980)等）を1.5～4.0%の硫酸もしくは塩酸酸性水溶液中、1.5～5倍モルの亜硝酸ナトリウムと作用させ、6-ジアゾフラビン誘導体を生じさせた後、これを単離することなくテオシアノ酸カリウムと作用させることにより合成出来る。

また、6-チオシアナトフラビン誘導体を水溶液中、還元剤（例えばハイドロサルファイナトリウム、水酸化ホウ素ナトリウム、ジチオスレイトールなど）と作用させるか、または光照射下にEDTAと作用させることにより目的とする一般式(I)中、R₄がメルカブト基である6-メルカブトフラビン誘導体が合成出来る。6-チオシアナトフラビン誘導体、および6-メルカブトフラビン誘導体の何れも通常の再結晶法または分子ふるい、シリカゲルカラム、樹脂カラム等の精製法により単離することが可能である。

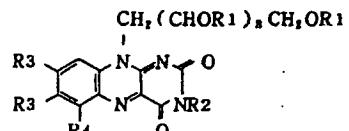
この発明のフラビン誘導体の製造方法の一実施

で示される6-メルカブトフラビン誘導体を得るものである。

[実施例]

以下、この発明の実施例について述べるが、これらに限定されない。

この発明の新規なフラビン誘導体は一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はチオシアナト基またはメルカブト基を表わす)

で示される。この発明の新規なフラビン誘導体としては、例えば6-チオシアナト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンおよび6-メルカブト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンなどがある。

一般式(I)で示されるフラビン誘導体中、R₄がチ

オシアナト基である6-チオシアナト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンの合成について述べる。即ち、6-アミノ-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビン 1.00g (1.79mmole) を、濃硫酸 10mL および氷水 30mL の 0°C 混液中に懸濁する。97% 亜硝酸ナトリウム 19.05mg (2.68mmole) を 0°C で添加後、15分間同温で搅拌する。尿素 19.55mg を 0°C で添加し、過剰の亜硝酸ナトリウムを分解して、さらに15分間搅拌する。充分に分解させた後、飽和チオシアノ酸カリウム水溶液 0.85mL を 0°C で加え、窒素ガスの発生が止むまで（約30分）搅拌する。

25% アンモニア水 30mL を内温 150 以下で、最終液性が pH2 になるようにする。反応液をクロロホルムの 50mL で 3 回、合計 150mL で抽出を行い、合わせたクロロホルム溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥させる。減圧下溶媒を留去させた後、残渣をシリカゲルカラム（溶出液：アセトントベンゼン = 1 : 5）に付し、目的のフラクションを合わせ、減圧下溶媒を留去する。残留物をクロロ

ホルムとヘキサンの混合物より再結晶することにより、目的の 6 - チオシアト - 2', 3', 4', 5' - テトラアセチルリポフラビンの黄色結晶 367 mg が得られる。收率は、341% である。

なお、上記化合物が以下に示す測定結果により、目的化合物であることを同定した。

融点 138° - 142°C

元素分析 (%) 計測値 C, 51. 92, H, 4. 52, N, 11. 62

実測値 C, 51. 65, H, 4. 52, N, 11. 52

赤外線吸収スペクトル IR (KBr, cm⁻¹) 3470, 2150, 1740, 1580, 1535, 1215

核磁気共鳴 NMR (CDCl₃, δ ppm) 1. 82, 2. 09, 2. 21, 2. 31, 2. 66, 2. 76 (each 3H, s), 4. 25, 4. 44 (each 1H, d), 5. 41 (4H, broad), 5. 60 (1H, broad), 7. 77, 8. 61 (each 1H, S)

次に、この発明のフラビン誘導体の製造方法の一実施例の 6 - メルカブト - 2', 3', 4', 5' - テトラアセチルリポフラビンの合成について述べる。即ち、上記のようにして得た 6 - チオシアナト - 2', 3', 4', 5' - テトラアセチルリポフラビンの

体を用いて下記修飾法により例えば安定なフラビン修飾電極を製造することができる。

上記のように合成したフラビン誘導体を例えば 0.1 mg / 1 ~ 100 mg / 1 の濃度で水または緩衝液に溶解し、この溶液中に、水または濃い酸または有機溶剤等で洗浄した金、銀、白金などの金属、酸化スズなどの金属酸化物、シリコンや炭素などの半導体、等の導電性基板を 0.1 秒から 1 時間浸せきすることによって、フラビン修飾電極を得ることができる。

下記に、例えば金蒸着電極上へのチオシアナト - テトラアセチルリポフラビンの修飾について示す。即ち、第 2 図の金電極の正面図に示すように金を蒸着したガラス基板を蒸留水で洗浄した後、濃硝酸中に 10 分間浸せきして洗浄金電極とする。また、6 - チオシアナ - 2', 3', 4', 5' - テトラアセチルリポフラビンをリン酸緩衝液 (pH 7.0, 20mM) 中に 10 mg / 1 の濃度に溶解する。この水溶液に上述の洗浄金電極を 10 分間浸せきした後、水洗して、安定なフラビン修飾電極を得た。なお、図において

0.05M りん酸 2 水素カリウム - りん酸 2 ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いた 5.10 × 10⁻⁵ M 濃度の溶液を調整した後、安定剤として EDTA2 ナトリウムを 1.0 × 10⁻⁴ M となるように加え試料溶液とする。

これに、ジチオスレイトールを 8.0 × 10⁻⁴ M となるように加える。室温下、2 時間攪拌すると目的の 6 - メルカブト - 2', 3', 4', 5' - テトラアセチルリポフラビンが生じる。第 1 図に可視紫外吸収スペクトル図を示す。

次に 6 - メルカブト - 2', 3', 4', 5' - テトラアセチルリポフラビンの製造の他の方法について説明する。

EDTA2 ナトリウムを加えない以外は前述の実施例と同様に試料溶液を調整した後、窒素雰囲気下、ハイドロサルファイトナトリウムを 8.0 × 10⁻⁴ M になるように加え室温で 1 時間 30 分攪拌する。本操作により生じた 6 - メルカブト - 2', 3', 4', 5' - テトラアセチルリポフラビンの紫外吸収スペクトルは上記のそれと一致した。

なお、上記のようにして得られたフラビン誘導

て、(1)はガラス基板、(2)は金蒸着膜、(A)は 50 mm、(B)は 3 mm、(C)は 10 mm、(D)は 2 mm を示す。

サイクリックボルタノメトリによる修飾電極の安定性試験

リン酸緩衝液 (pH 7.0, 20mM) 中に過塩素酸ナトリウムを 100mM の濃度に溶解し、アルゴン通気により脱酸素し、これを電解液として上記修飾電極のサイクリックボルタノメトリを (0 ~ -600mV vs. Ag/AgCl, 携引速度 50mV/s) 測定し、このときのサイクルによる還元ピークの高さの変化を示す特性図を第 3 図に示す。3 サイクル以降、還元ピークの高さは、ほとんど変化せず、6 - チオシアナ - 2', 3', 4', 5' - テトラアセチルリポフラビンが安定に金表面に吸着していることを示すものである。なお、図において、縦軸はピーク電流値 (μA) を横軸はサイクル (回) を示す。

トクローム c の還元

トクローム c を 330 μM の濃度になるように上記電解液に溶解し、この溶液中で上記フラビン修飾電極を用いてサイクリックボルタノメトリを

行つた結果をチトクローム c を含まない場合と比較して第 4 図のサイクリックボルタモグラムに示す。酸化ピークは認められず、大きく還元電流が流れるようになることから、この修饰電極を用いることによつて、チトクローム c を還元はできるが酸化はできないようにすること、すなわち、電極からチトクローム c への一方向の電子移動のみ起こすこと、が可能になることがわかる。

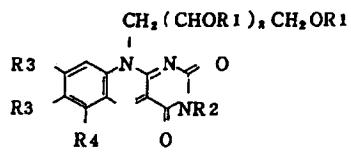
図において、(A)はチトクロムcを含まない時のサイクリツクボルタモグラム、(B)はチトクロムcを含むサイクリツクボルタモグラムを示す。又、縦軸は電流(μ A)を横軸はAg/AgCl電極に対する電圧(mV)を示す。

なお、電子伝達タンパク質として、チトクロームcの代りに、ルミフラビンを用いた場合も同様である。

(発明の効果)

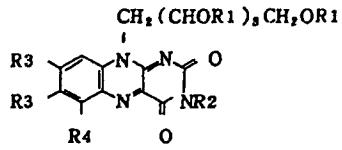
以上説明したとおり、この発明は一般式

合物とした後、テオシアン酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して一般式

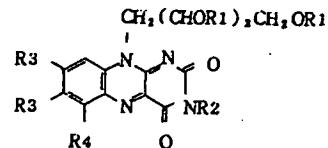


(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₁、R₂は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₃はテオシアナト基を表わす。)で示される6チオシアナトフラビン誘導体の製造方法を得ることができる。

又、この発明の別の発明は
一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)

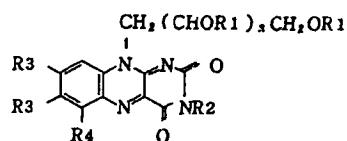


(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はテオシアナト基またはメルカプト基を表わす。)

で示される新規なフラビン誘導体である。

又この発明の別の発明は

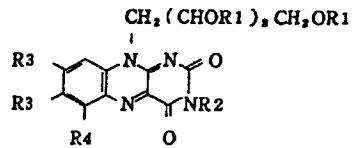
一 次 式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)

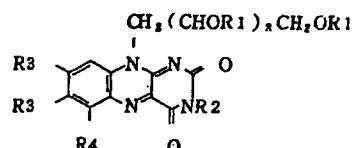
で示される 6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化

で示される 6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、テオシアニン酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はテオシアナト基を表わす。)

で示される 6 チオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はメルカブト基を表わす)

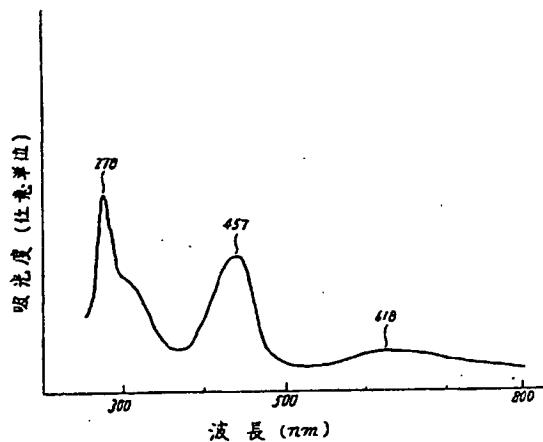
で示される6-メルカブトフラビン誘導体の製造方法を得ることができる。

4. 図面の簡単な説明

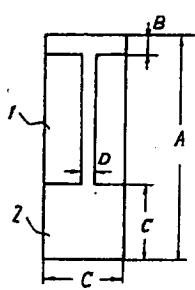
第1図はこの発明の一実施例の6-メルカブト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンの可視紫外吸収スペクトル図、第2図は金電極の正面図、第3図はこの発明の一実施例の6-チオシアノ-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンによる金電極の修飾に得られた修飾電極のサイクル(回)による還元ピークの高さ(μA)変化を示す特性図、第4図は上記修飾電極を用いたサイクリックポルタモグラムを示す。

代理人 大 岩 増 雄

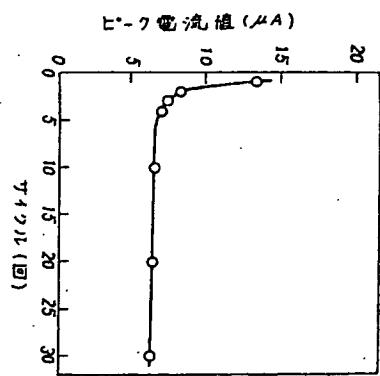
第1図



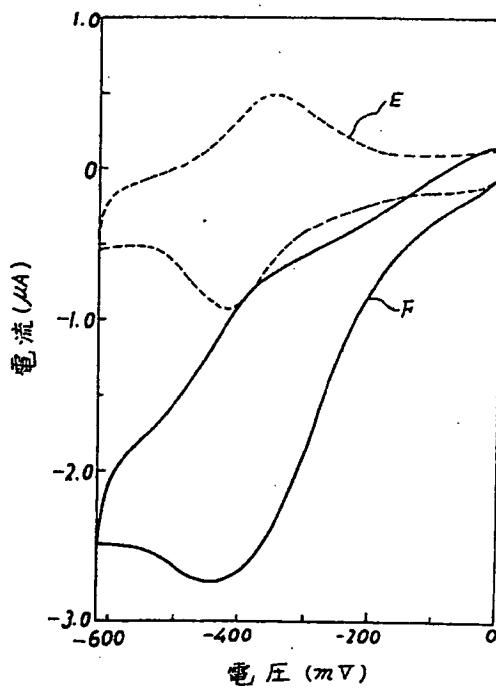
第2図



第3図



第4図



手続補正書(自発)
63 3 23
昭和 年 月 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示 特願昭 62-262256号

2. 発明の名称 フラビン誘導体およびその製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
住所 東京都千代田区丸の内二丁目2番3号
名称 (601)三菱電機株式会社
代表者 志岐守哉

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内二丁目2番3号
三菱電機株式会社内
氏名 (7375)弁理士 大岩増雄
(連絡先03(213)3421特許部)

5. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲、発明の詳細な説明および図面の簡単な説明の欄

方式
審査

に訂正する。

(1) 同第19頁第9行の「修飾に得られた」を「修飾により得られた」に訂正する。

7. 添付書類の目録

補正後の特許請求の範囲を記載した書面 1通

以上

6. 補正の内容

(1) 明細書の特許請求の範囲を別紙のとおり訂正する。

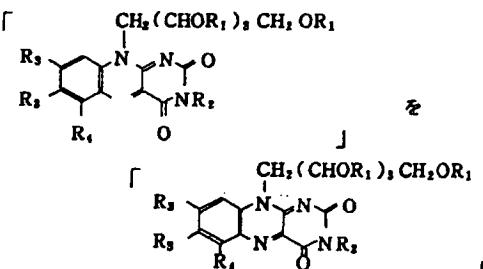
(2) 同第9頁第10~11行の「ハイドロサルファイナトリウム」を「ハイドロサルファイトナトリウム」に訂正する。

(3) 同第11頁第2行の「チオシアト」を「チオシアナト」に訂正する。

(4) 同第11頁第8行の「計測値」を「計算値」に訂正する。

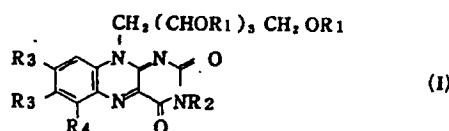
(5) 同第13頁第16行および第14頁第12~13行の「チオシアナ」をそれぞれ「チオシアナト」に訂正する。

(6) 同第17頁第3~6行の



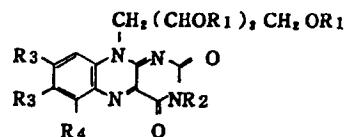
特許請求の範囲

(1) 一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子またはアシル基を、R₁、R₃は水素原子または炭素数1~4個の低級アルキル基を、R₄はチオシアナト基またはメルカブト基を表わす。)で示されるフラビン誘導体。

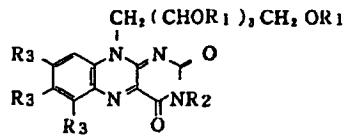
(2) 一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1~4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)

で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化

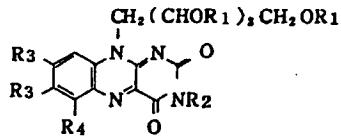
合物とした後、チオシアノ酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解する、一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はナオシアナト基を表わす。)

で示される6-チオシアナトフラビン誘導体の製造方法。

(3) 一般式

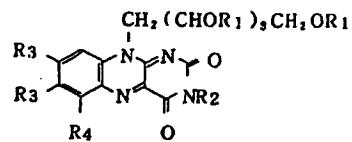


(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素原子1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)

で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化

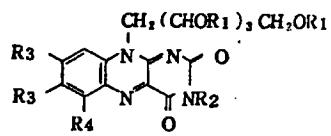
方法。

合物とした後、チオシアノ酸塩と作用させ、また必要に応じエステル加水分解して一般式



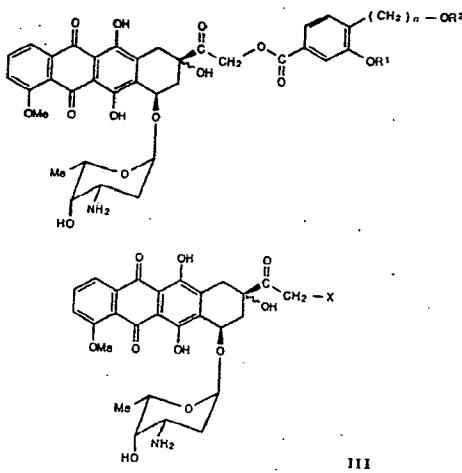
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はテオシアナト基を表わす。)

で示される6-チオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じてエステルを加水分解する一般式



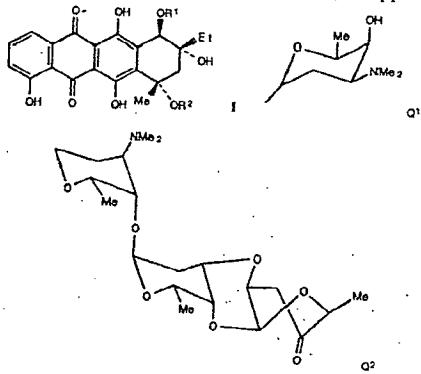
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はメルカブト基を表わす)

で示される6-メルカブトフラビン誘導体の製造



umycin.

: 174598b Preparation of anthracycline derivatives as statics. Berscheid, Hans Gerd; Fehlhaber, Hans Wolfram chst A.-G.) Eur. Pat. Appl. EP 311,002 (Cl. C07H15/252), 12 1989, DE Appl. 3,733,885, 07 Oct 1987; 9 pp. The title



[s. [I; R¹ = Q¹, R² = Q²; R¹ = Q², R² = Q³] and their acetoxytically acceptable acid salts, useful as cytostatics, are via epimerization of I [R¹ = Q¹, R² = Q³ (II); R¹ = Q³, R² = Q², except that the D-cinerulose B residue is replaced by an ulose B residue]. A hydrolysis product mixt. (15 g) obtained Streptomyces purpurascens DSM 2658 culture (according to 0 131, 942) was dissolved in a 130:40:50 mixt. of CHCl₃, H₂O and the soln. was eluted over a pH 8.0 kieselguhr with the same solvent system to give a fraction contg. 2.4 g of mainly II and cytorhodin S. In an in vitro study II had 8 × 10⁻³, 2.1 × 10⁻³, and 3.4 × 10⁻³ µg/mL, resp., against L 1T 29, and A 549 tumor cells.

: 174599c Synthesis of lacto-series glycosphingolipids. Tomoya; Sato, Susumu; Ito, Yukinari (Institute of Physical & Chemical Research) Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01 56,693 693] (Cl. C07H15/04), 03 Mar 1989, JP Appl. 87/53,403, 1987; 25 pp. Glycosphingolipids [I; X = β-Q where R¹ = H; at least one of R¹-R³ = oligosaccharide residue and the H] (II) were prep'd. by glycosidation of ceramides QH(R⁴) (ring group) with glycosidic donors I [X = halo, OC(NH)CCl₃; R¹ = Mes; at least one of R¹-R³ = Ac-protected oligosaccharide and esters = Ac] and deprotection of the resulting I (X = β-Q = protecting group; R-R³ = same as above). To a mixt. of I (X = α-OC(NH)CCl₃, R = COCMes, R¹ = R³ = Ac, R² here R³ = Ac) (prep'n. given) 0.05, a silylceramide QH (R⁴ = Me) (III) (0.064 mmol, and 300 mg mol. sieve 4A in CHCl₃, 4 CF₃SO₂SiMe₃ was injected and the mixt. was stirred 1h at 100°C, to give 52.4% I (X = β-Q where R⁴ = SiPh₂CMes, R = a, R¹ = R³ = Ac, R² = Q¹ where R⁵ = Ac) (IV) which was dried with Bu₄NF in MeOH-THF, acetylated with Ac₂O/pyridine, after gel filtration, 71.0% I (X = β-Q, R² = Q¹, R = R¹ = H) (V).

